

Figura 19.19 Modello chemiosmotico. In questa semplice rappresentazione schematica della teoria chemiosmotica applicata ai mitocondri, gli elettroni del NADH e di altri substrati ossidabili vengono trasferiti a una catena di trasportatori disposti asimmetricamente nella membrana interna. Il flusso degli elettroni è accompagnato da una traslocazione di protoni attraverso la membrana, che produce

un gradiente protonico (ΔpH) e un gradiente elettrico ($\Delta\psi$), che insieme costituiscono la forza motrice protonica. La membrana mitocondriale interna è impermeabile ai protoni; essi possono rientrare nella matrice solo attraverso specifici canali protonici (F_0). La forza motrice protonica che spinge i protoni verso la matrice fornisce l'energia necessaria per la sintesi di ATP, catalizzata dal complesso F_1 associato a F_0 .

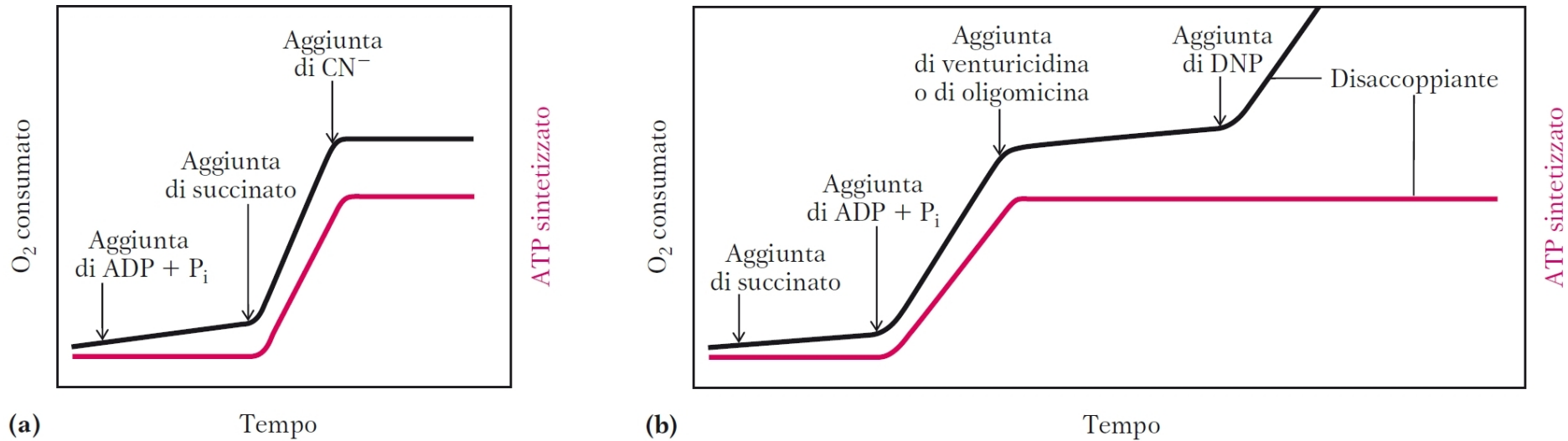
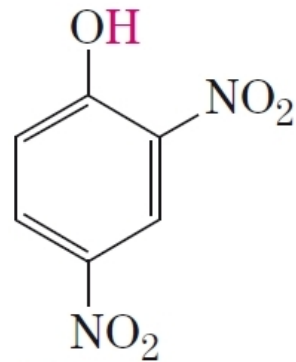


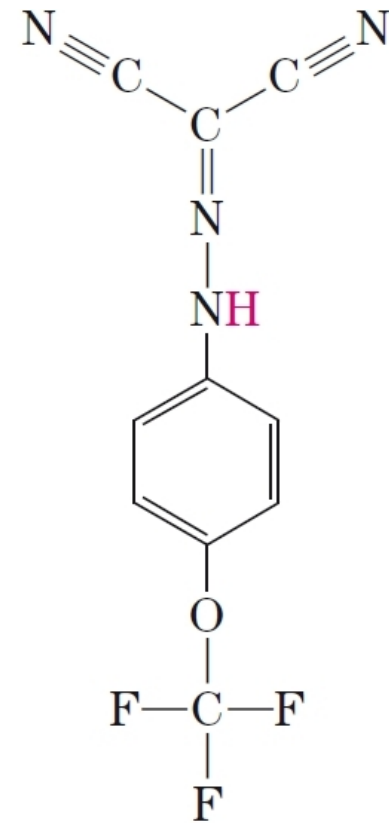
Figura 19.20 Accoppiamento del trasferimento elettronico e della sintesi di ATP nei mitocondri. In esperimenti finalizzati a dimostrare l'accoppiamento, i mitocondri vengono sospesi in un mezzo tamponato in cui è immerso un elettrodo a ossigeno per misurarne il consumo. A vari intervalli di tempo vengono prelevati campioni della soluzione per determinare la concentrazione di ATP. (a) L'aggiunta solo di ADP e P_i determina uno scarso aumento sia della respirazione (consumo di ossigeno; linea nera) sia della sintesi di ATP (linea rossa). Se si aggiunge succinato, la respirazione e la sintesi di ATP

hanno subito inizio. L'aggiunta di cianuro (CN^-), che blocca il trasferimento degli elettroni dalla citocromo ossidasi (Complesso IV) all' O_2 , inibisce sia la respirazione sia la sintesi di ATP. (b) Dopo l'aggiunta di succinato, i mitocondri respirano e sintetizzano ATP solo se vengono aggiunti ADP e P_i . La successiva aggiunta di venturicidina o di oligomicina, che inibiscono l'ATP sintasi, blocca la respirazione e la sintesi di ATP. Il dinitrofenolo (DNP), invece, è un disaccoppiante: permette la respirazione, ma blocca la sintesi di ATP.



2,4-Dinitrofenolo
(DNP)

Figura 19.21 Due composti chimici che disaccoppiano la fosforilazione ossidativa. Il DNP e l' FCCP hanno entrambi un protone dissociabile (in rosso) e sono molto idrofobici. Essi agiscono trasportando protoni attraverso la membrana mitocondriale interna e dissipando il gradiente protonico. I due composti disaccoppiano anche la fotofosforilazione.



Carbonilcianuro-
p-trifluorometossifenilidrazone
(FCCP)

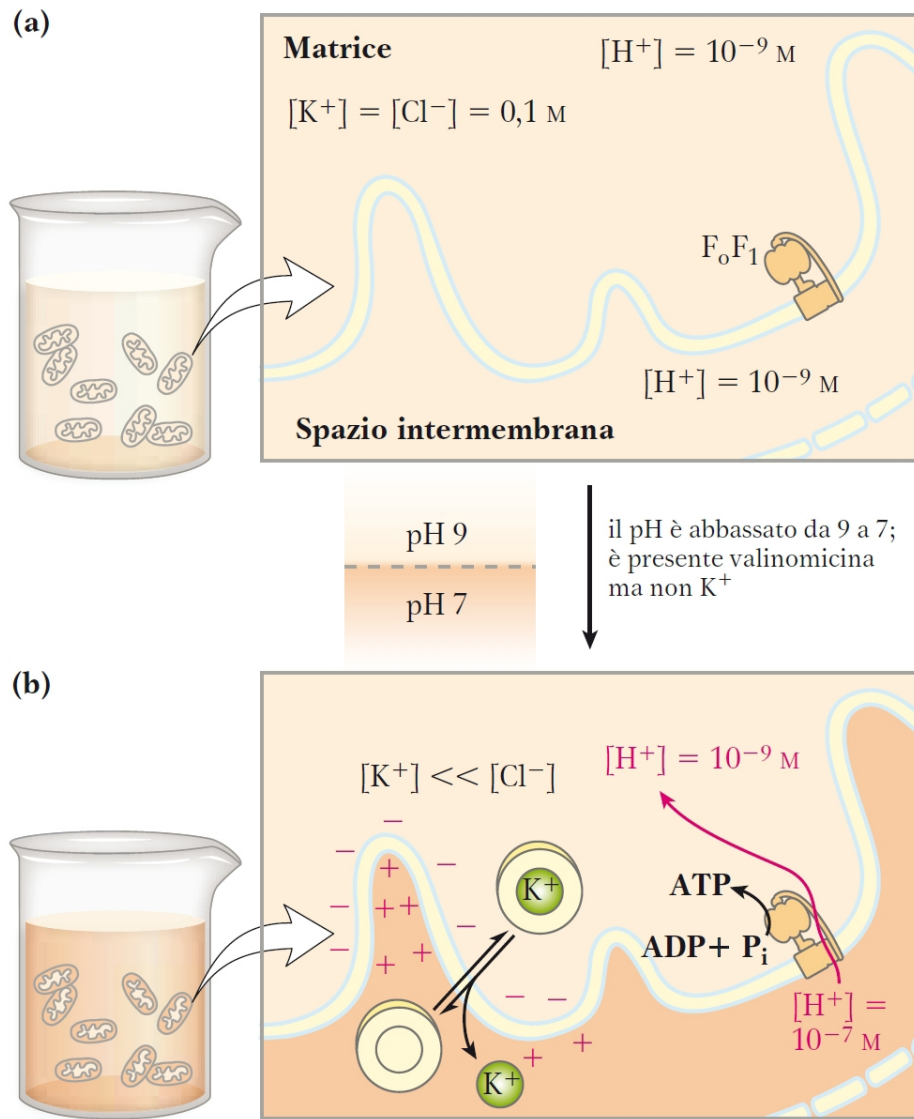


Figura 19.22 Dimostrazione del ruolo di un gradiente protonico nella sintesi dell'ATP. Un gradiente elettrochimico prodotto artificialmente può indurre la sintesi di ATP in assenza di un substrato ossidabile come donatore di elettroni. In questo esperimento in due fasi, i mitocondri isolati sono prima incubati in una soluzione tampone a pH 9 contenente 0,1 M KCl (a). Il lento scambio di tampone e KCl tra soluzione e mitocondri porta la matrice a equilibrarsi con l'ambiente acquoso circostante. Non sono presenti substrati ossidabili. (b) Nella seconda fase, i mitocondri vengono tolti dalla soluzione a pH 9 e sospesi in una nuova soluzione a pH 7 contenente valinomicina, ma non KCl. Le diverse caratteristiche della soluzione creano una differenza di pH di circa due unità. Il flusso verso l'esterno degli ioni K^+ trasportati dalla valinomicina crea uno squilibrio di cariche tra le due facce della membrana (il lato della matrice è negativo). La somma del potenziale chimico derivato dalla differenza di pH e del potenziale elettrico generato dalla separazione di carica è una forza motrice protonica largamente sufficiente a innescare la sintesi di ATP, anche in assenza di substrati ossidabili.

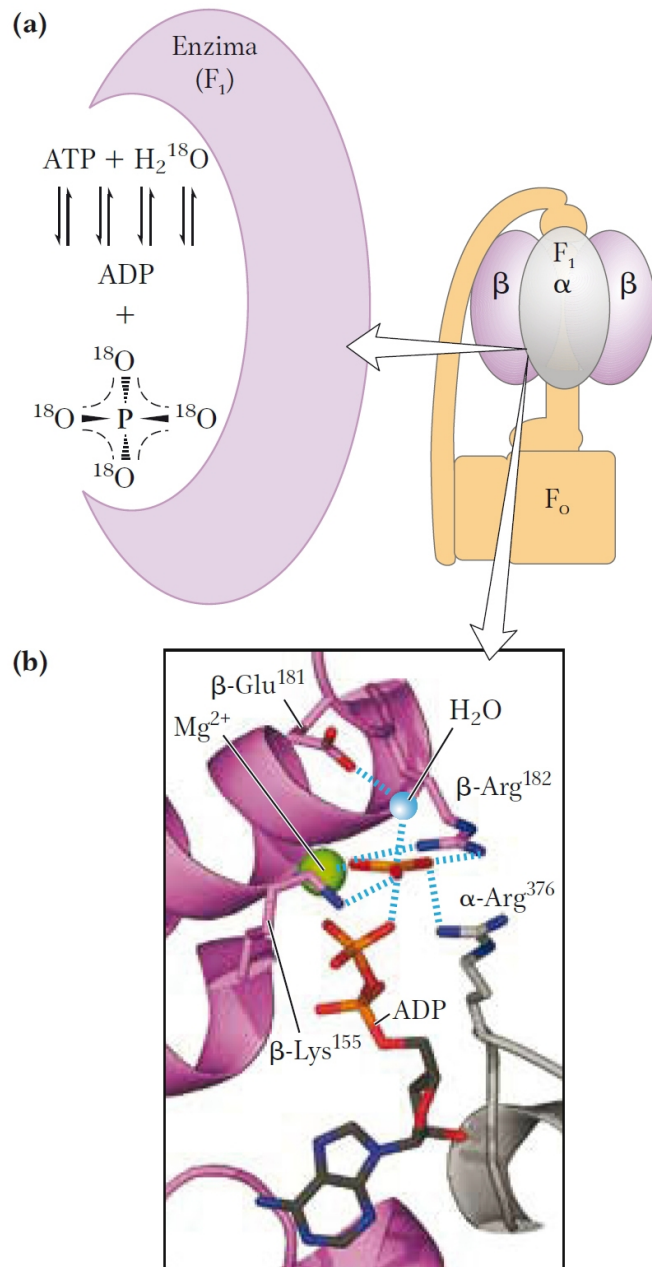


Figura 19.23 Il meccanismo catalitico di F₁. (a) Esperimenti di scambio di ¹⁸O. F₁ solubilizzato dalle membrane mitocondriali viene incubato con ATP in presenza di acqua marcata con ¹⁸O. A vari intervalli viene prelevato un campione di questa soluzione, che viene poi analizzato per determinare l'incorporazione di ¹⁸O nella molecola di P_i prodotta dall'idrolisi di ATP. Dopo qualche minuto il P_i contiene da tre a quattro atomi di ¹⁸O, il che indica che durante l'incubazione sono avvenute sia l'idrolisi sia la sintesi di ATP. (b) Viene mostrato lo stato di transizione probabile per l'idrolisi e la sintesi dell'ATP da parte dell'ATP sintasi. La subunità α è illustrata in colore grigio, quella β in viola. I residui con carica positiva β-Arg¹⁸² e α-Arg³⁷⁶ coordinano due atomi di ossigeno appartenenti all'intermedio fosfato pentavalente; il β-Lys¹⁵⁵ interagisce col terzo atomo di ossigeno e lo ione Mg²⁺ (la sfera verde) stabilizza ulteriormente l'intermedio. La sfera azzurra rappresenta il gruppo in uscita (H₂O). Queste interazioni conducono al rapido equilibrio tra ATP e ADP + P_i nel sito attivo. [Fonte: (b) tratta da PDB ID 1BMF, J.P. Abrahams et al., *Nature* 370:621, 1994.]

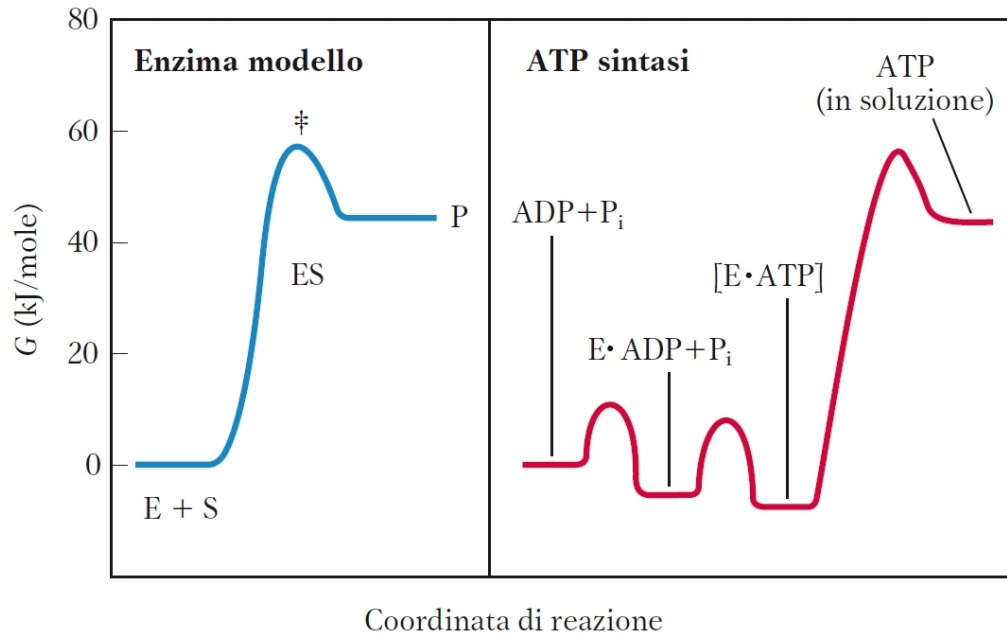


Figura 19.24 Diagrammi delle coordinate di reazione dell'ATP sintasi e di un enzima modello. In una reazione catalizzata da un enzima modello (a sinistra), la principale barriera energetica da superare è il raggiungimento dello stato di transizione (\ddagger) tra substrato e prodotto. Nella reazione catalizzata dall'ATP sintasi (a destra), la principale barriera energetica è il rilascio di ATP dall'enzima, e non la sua formazione. La variazione di energia libera per la formazione di ATP da ADP e P_i in una soluzione acquosa è ampia e di segno positivo, mentre sulla superficie enzimatica il legame molto saldo dell'ATP all'enzima fornisce una quantità di energia di legame che abbassa l'energia libera dell'ATP legato all'enzima a valori simili a quelli dell'ADP + P_i . La reazione è quindi facilmente reversibile e la sua costante di equilibrio è vicina a 1. L'energia libera richiesta per il rilascio dell'ATP è fornita dalla forza motrice protonica.

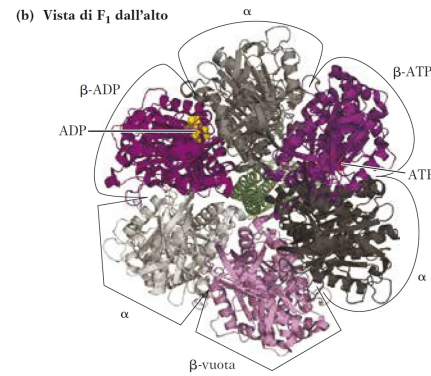
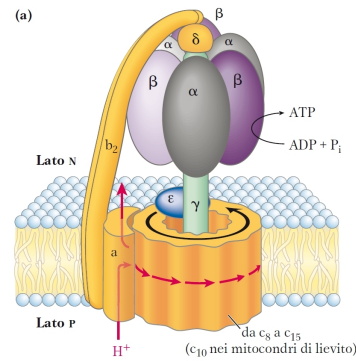
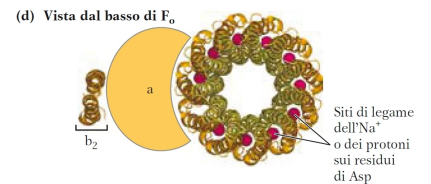
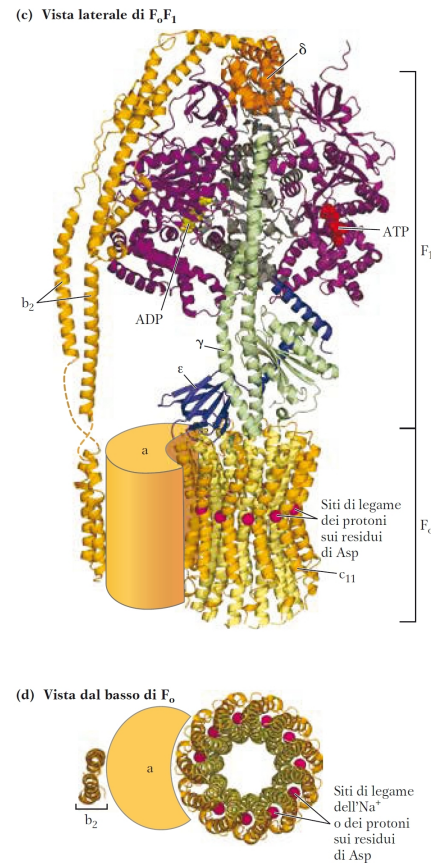


Figura 19.25 Il complesso dell'ATP sintasi mitocondriale. (a) Rappresentazione schematica del complesso della F_0F_1 . (b) Vista dall'alto del complesso F_1 (cioè dal lato N della membrana), che evidenzia le tre subunità β (ombreggiate in viola), le tre subunità α (ombreggiate in grigio) e lo stelo centrale (subunità γ , in verde). Ciascuna subunità β , vicino alla sua interfaccia con la subunità α , ha un sito di legame per i nucleotidi, essenziale per la sua attività catalitica. La subunità γ si associa a una delle tre coppie $\alpha\beta$, inducendo ciascuna delle tre subunità β a modificare la propria conformazione, con siti diversi per il legame di nucleotidi. Nell'enzima cristallino, una subunità (β -ADP) ha l'ADP (in giallo) legato nel sito di legame, la successiva subunità (β -ATP) ha nel sito attivo l'ATP (in rosso) e la terza (β -vuota) non ha nucleotidi legati. (c) Vista laterale dell'enzima intero (dal piano della membrana). La porzione F_1 ha tre subunità α e tre subunità β disposte come tre spicchi di un'arancia che si alternano intorno a uno stelo centrale, la subunità γ (in verde). (Due subunità α e una subunità β sono state omesse per evidenziare la subunità γ e i siti di legame dell'ATP e dell'ADP sulle subunità β .) La subunità δ conferisce la sensibilità all'oligomicina dell'ATP sintasi, e la subunità ϵ può servire in alcune circostanze a inibire l'attività ATPasica. La subunità F_0 è costituita da una subunità a e da due subunità b che ancorano il complesso F_0F_1 alla membrana e agiscono da statore, mantenendo le subunità α e β nel posto corretto. F_0 comprende anche l'anello c , costituito da un certo numero (da 8 a 15, a seconda della specie) di subunità c identiche, piccole proteine idrofobiche. L'anello c e la subunità a interagiscono per fornire una via transmembrana per i protoni. Ciascuna subunità c in F_0 ha un residuo di Asp fondamentale vicino al centro della membrana, che può protonarsi o deprotonarsi durante il ciclo catalitico dell'ATP sintasi. Qui è mostrato l'anello omologo c_{11} della Na^+ -ATPasi di *lyobacter tartaricus*, la cui struttura è stata già determinata. I siti di legame dell' Na^+ nell'anello c_{11} , che corrispondono ai siti di legame dei protoni nel complesso F_0F_1 , sono mostrati con gli ioni Na^+ (sfere rosse) legati. (d) Vista di F_0 perpendicolare alla membrana. Come in (c), le sfere rosse rappresentano i siti di legame per gli ioni Na^+ o per i protoni presenti sui residui di Asp. [Fonti: F_1 : PDB ID 1BMF, J.P. Abrahams et al., *Nature* 370:621, 1994; PDB ID 1JNV, A.C. Hausrath et al., *J. Biol. Chem.* 276:47.227, 2001; PDB ID 2A7U, S. Wilkens et al., *Biochemistry* 44:11.786, 2005; PDB ID 2CLY, V. Kane Dickson et al., *EMBO J.* 25:2911, 2006; F_0 : PDB ID 1B9U, O. Dmitriev et al., *J. Biol. Chem.* 274:15.598, 1999. Anello c : PDB ID 1YCE, T. Meier et al., *Science* 308:659, 2005.]



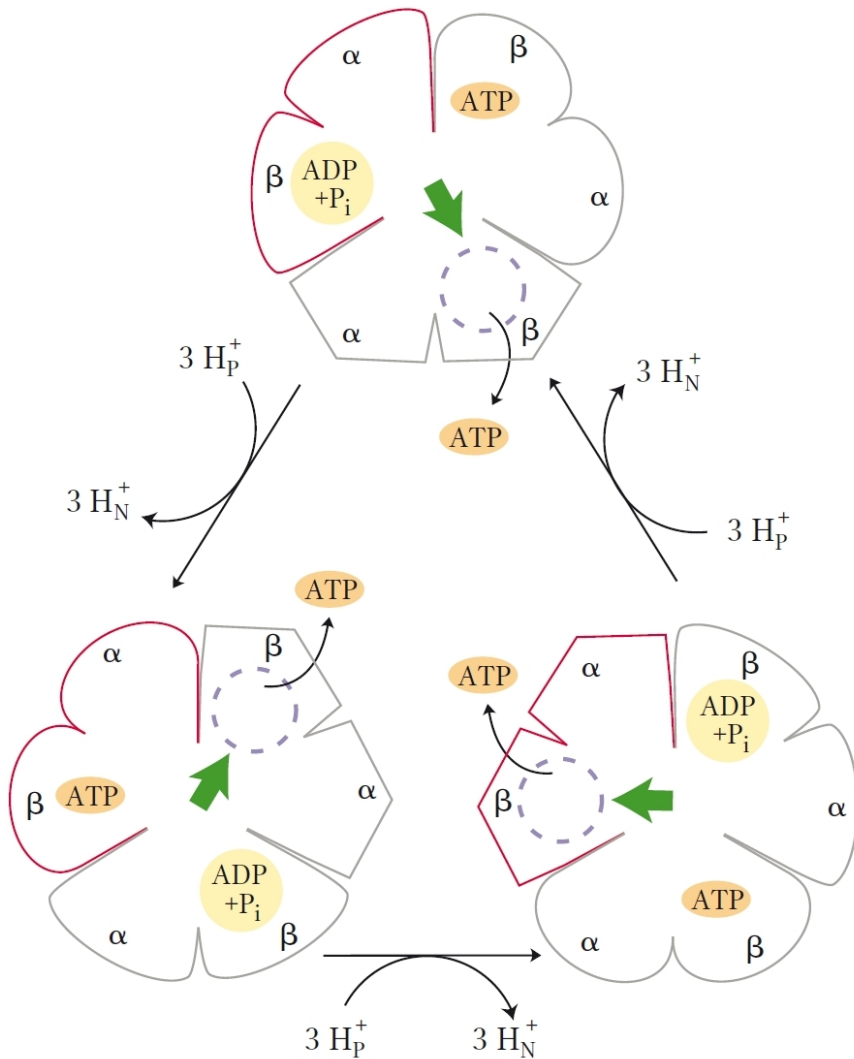
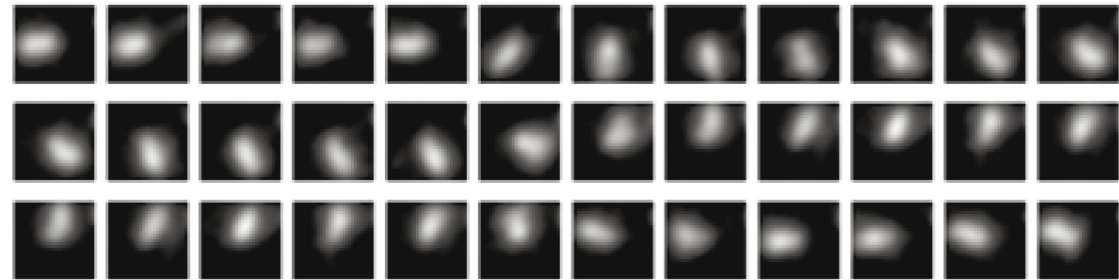
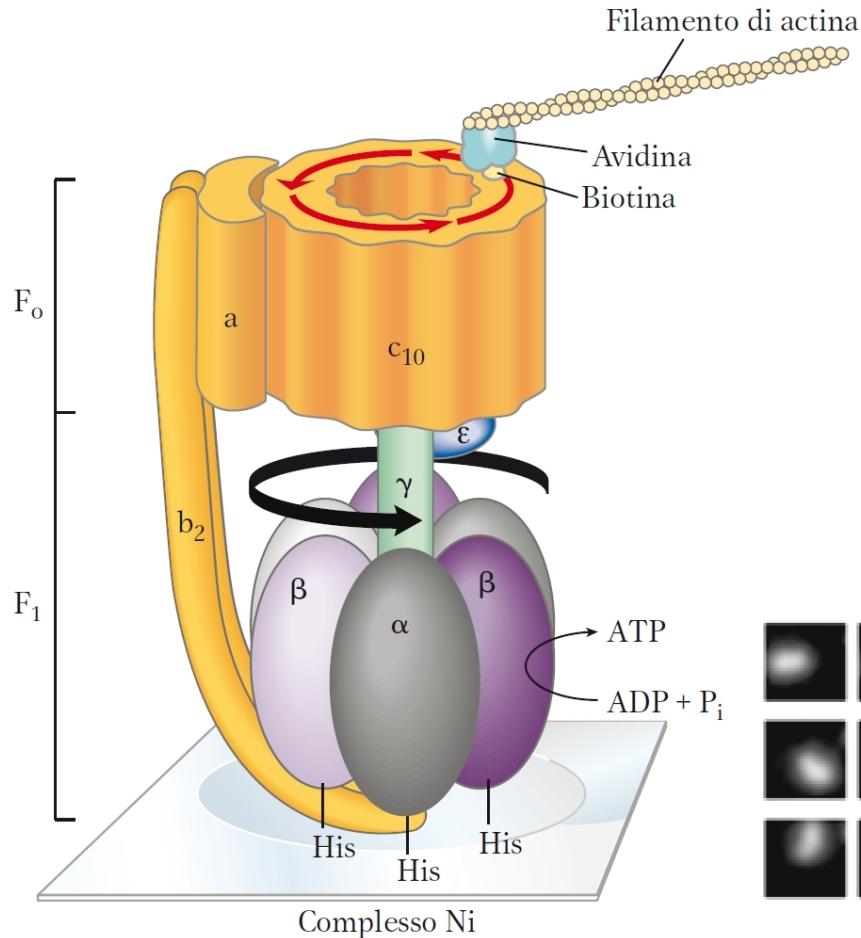


Figura 19.26 Modello di “alterazione di legame” dell’ATP sintasi. Il complesso F_1 ha tre siti non equivalenti per il legame dei nucleotidi adenilici, uno per ciascuna coppia di subunità α e β . In ogni momento uno di questi siti si trova nella conformazione β -ATP (che lega saldamente l’ATP), il secondo si trova nella conformazione β -ADP (che lega debolmente l’ATP), mentre il terzo è nella conformazione β -vuota (che lega molto debolmente l’ATP). In questa vista dal lato N, la forza motrice protonica provoca la rotazione dello stelo centrale, la subunità γ indicata da una freccia verde, che viene a contatto in successione con ciascuna subunità $\alpha\beta$. Il contatto genera una modificazione conformazionale cooperativa in cui il sito β -ATP assume la conformazione β -vuota e l’ATP si dissocia; il sito β -ADP assume la conformazione β -ATP, che promuove la condensazione dell’ADP e del P_i a esso legati, formando ATP; il sito β -vuoto assume la conformazione β -ADP e lega ADP e P_i provenienti dal solvente. Questo modello, basato su numerosi dati sperimentali, comporta che almeno due dei tre siti catalitici si alternino nella loro azione. L’ATP non può essere rilasciato da un sito se l’ADP e il P_i non sono legati all’altro. Si noti che la direzione di rotazione si inverte quando l’ATP sintasi agisce come un’ATPasi, come nell’esperimento descritto nella Figura 19.27.

Figura 19.27 Dimostrazione sperimentale della rotazione di F_0 e di γ . F_1 geneticamente modificato in modo da contenere una serie di residui di His è stato fatto aderire a un vetrino ricoperto con un complesso Ni; inoltre, a una subunità c è stata associata la biotina mediante un legame covalente. La proteina avidina, che lega la biotina molto saldamente, è stata associata covalentemente a un lungo filamento di actina fluorescente. Il complesso biotina-avidina unisce il filamento di actina alla subunità c. Si è visto che quando viene fornito ATP come substrato per l'attività ATPasica di F_1 il filamento fluorescente ruota continuamente in una sola direzione, dimostrando che ruota anche il cilindro F_0 della subunità c. In un altro esperimento il filamento fluorescente di actina era attaccato direttamente alla subunità γ . La serie di micrografie a fluorescenza (da sinistra a destra) mostra la posizione del filamento di actina a intervalli di 133 ms. Si noti che il filamento, quando ruota, compie un salto ogni undici fotogrammi circa. Presumibilmente il cilindro e la subunità γ si muovono come un unico insieme. [Fonti: disegno: informazioni tratte da Y. Sambongi et al., *Science* 286:1722, 1999. Micrografie: per gentile concessione di Ryohei Yasuda e Kazuhiko Kinosita, da R. Yasuda et al., *Cell* 93:1117, 1998. © Elsevier.]



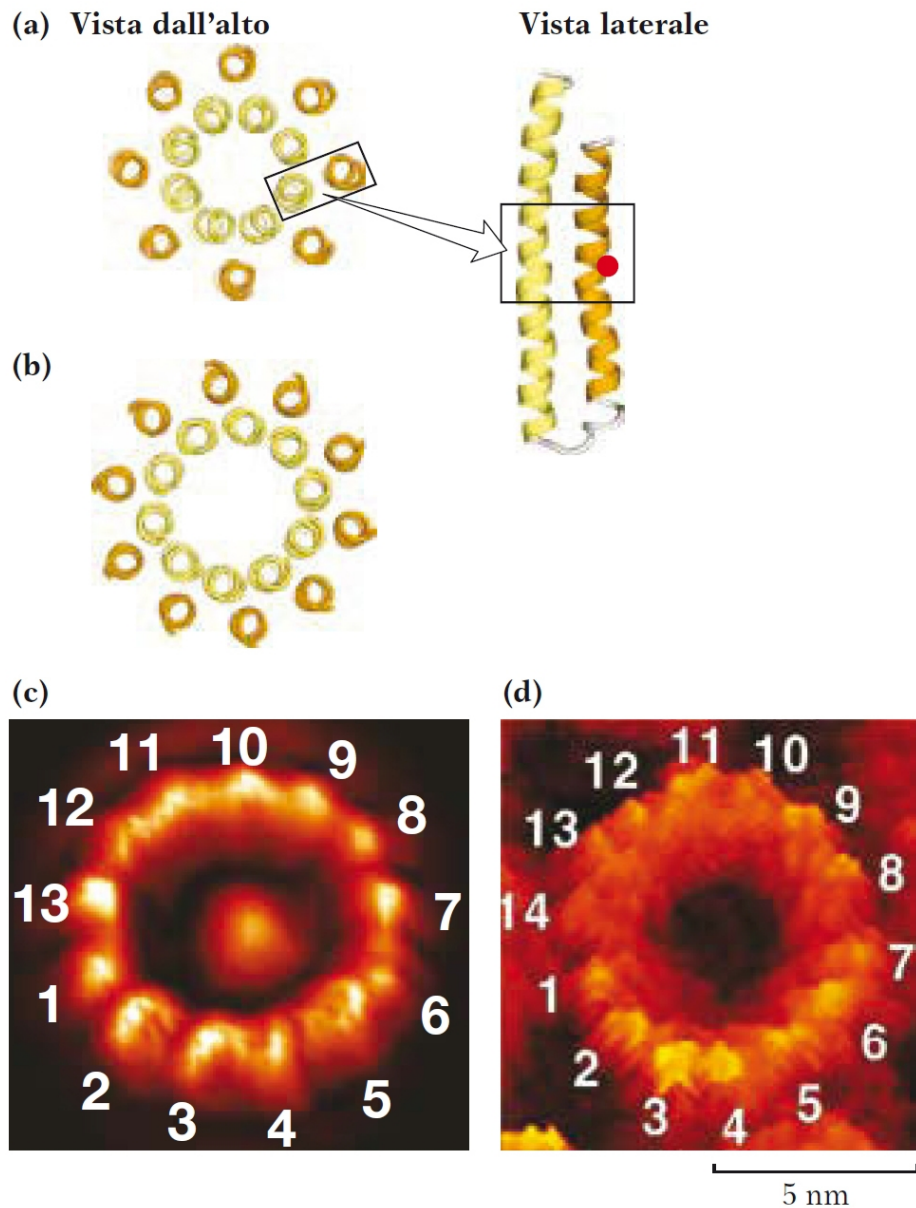


Figura 19.29 I diversi organismi hanno quantità diverse di subunità c nell'anello c del complesso F₀. È stata determinata la struttura dell'anello c di diverse specie utilizzando la cristallografia ai raggi X. Ciascuna elica presente nell'anello interno è metà di una subunità c a forma di forcina. L'anello esterno delle eliche costituisce l'altra metà della struttura a forcina. Il residuo di ASP essenziale nella posizione 61 è indicato dal pallino rosso. Le immagini dell'anello c perpendicolari alla membrana mostrano il numero delle subunità c per (a) i mitocondri bovini (8 subunità) e (b) i mitocondri di lievito (10 subunità). Il microscopio a forza atomica (vedi il Box 19.3) è stato utilizzato per vedere gli anelli c del (c) batterio termofilo della specie *Bacillus TA2.A1* (13 subunità) e (d) degli spinaci (14). In accordo con il modello mostrato nella Figura 19.28, numeri differenti di subunità c nell'anello c dovrebbero determinare rapporti diversi di ATP formati per ogni coppia di elettroni che passa attraverso la catena respiratoria (per esempio, rapporti P/O differenti). [Fonti: (a) PDB ID 1OHH, E. Cabezon et al., *Nature Struct. Biol.* 10:744, 2003. (c) D. Matthies et al., *J. Mol. Biol.* 388:611, 2009. (d) H. Seelert et al., *Nature* 405:418, 2000. Ristampata con l'autorizzazione di Macmillan Publishers Ltd.]

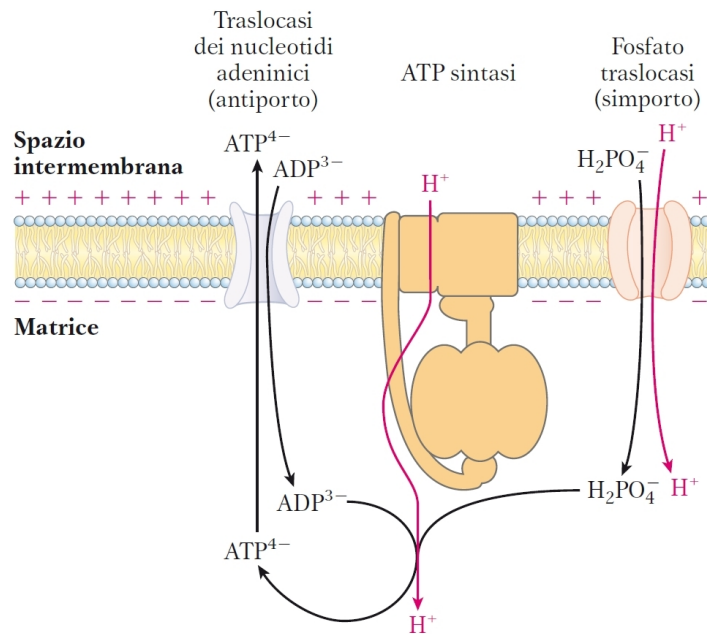


Figura 19.30 Traslocasi dei nucleotidi adeninici e fosfato traslocasi. Sistemi di trasporto presenti nella membrana mitocondriale interna portano ADP e P_i nella matrice e consentono all'ATP appena sintetizzato di uscire nel citosol. La traslocasi dei nucleotidi adeninici è un antiporto; la stessa proteina trasferisce l'ADP nella matrice e l'ATP all'esterno. Il trasporto, sostituendo una molecola di ATP^{4-} con una di ADP^{3-} , ha come risultato un efflusso di cariche negative, favorito dal fatto che la matrice è più negativa rispetto all'esterno. A pH 7, il P_i è presente sia sotto forma di HPO_4^{2-} sia di H_2PO_4^- , ma la fosfato traslocasi è specifica per H_2PO_4^- . Non vi è flusso netto di cariche durante il simporto H_2PO_4^- e H^+ , ma la bassa concentrazione di protoni nella matrice favorisce il passaggio degli ioni H^+ in questa direzione. Quindi la forza motrice protonica fornisce l'energia necessaria alla sintesi di ATP da parte dell'ATP sintasi, ma contribuisce anche a trasportare i substrati (ADP e P_i) nella matrice e i prodotti (ATP) fuori dalla matrice mitocondriale. Tutti e tre questi sistemi di trasporto possono essere isolati come un singolo complesso legato alla membrana (l'ATP sintasoma).

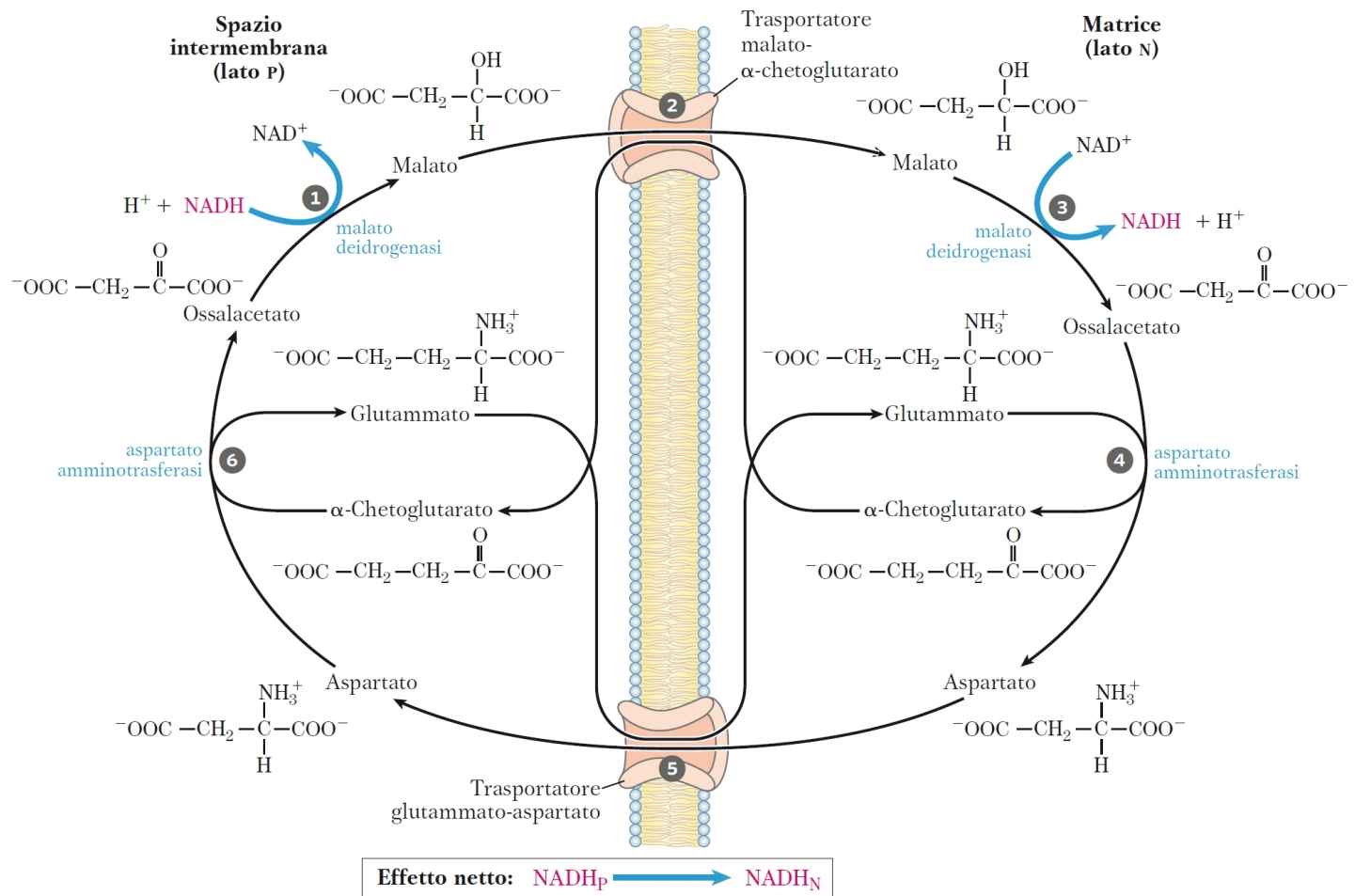


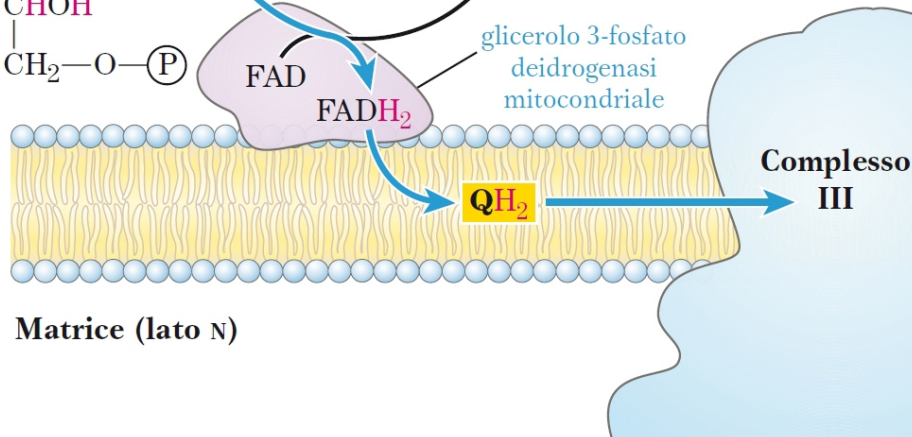
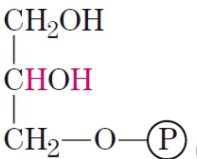
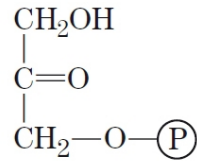
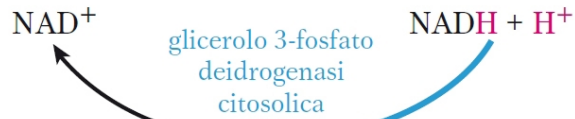
Figura 19.31 Sistema navetta (shuttle) del malato-aspartato.

Questo sistema navetta per il trasporto degli equivalenti riducenti dal NADH citosolico alla matrice mitocondriale è attivo nel fegato, nei reni e nel cuore. ❶ Il NADH citosolico entra nello spazio intermembrana attraverso delle aperture nella membrana esterna (porine), poi passa i suoi due equivalenti riducenti all'ossalacetato per produrre malato. ❷ Il malato viene trasportato attraverso la membrana interna dal trasportatore malato- α -chetoglutarato. ❸ Nella matrice il malato trasferisce i suoi due equivalenti riducenti

al NAD⁺; il NADH così generato viene poi riossidato dalla catena respiratoria mitocondriale. L'ossalacetato, il prodotto di ossidazione del malato, non può ritornare direttamente nel citosol e quindi viene prima transaminato ad aspartato ❹, che può uscire dai mitocondri attraverso il trasportatore glutammato-aspartato ❺. L'ossalacetato viene rigenerato nel citosol e ❻ il ciclo è così completato; il glutammato prodotto nella stessa reazione entra nella matrice tramite il trasportatore glutammato-aspartato.

Spazio intermembrana
(lato P)

Glicolisi



Matrice (lato N)

Figura 19.32 Il sistema navetta (shuttle) del glicerolo 3-fosfato. Questo sistema alternativo di trasferimento degli equivalenti riducenti dal citosol alla catena respiratoria è attivo nel muscolo scheletrico e nel cervello. Il diidrossiacetone fosfato nel citosol accetta due equivalenti riducenti dal NADH citosolico in una reazione catalizzata dalla glicerolo 3-fosfato deidrogenasi, anch'essa citosolica. Un isozima della glicerolo 3-fosfato deidrogenasi legato alla faccia esterna della membrana mitocondriale interna trasferisce poi due equivalenti riducenti dal glicerolo 3-fosfato presente nello spazio intermembrana all'ubichinone. Si noti che questo sistema navetta non coinvolge sistemi di trasporto attraverso la membrana.

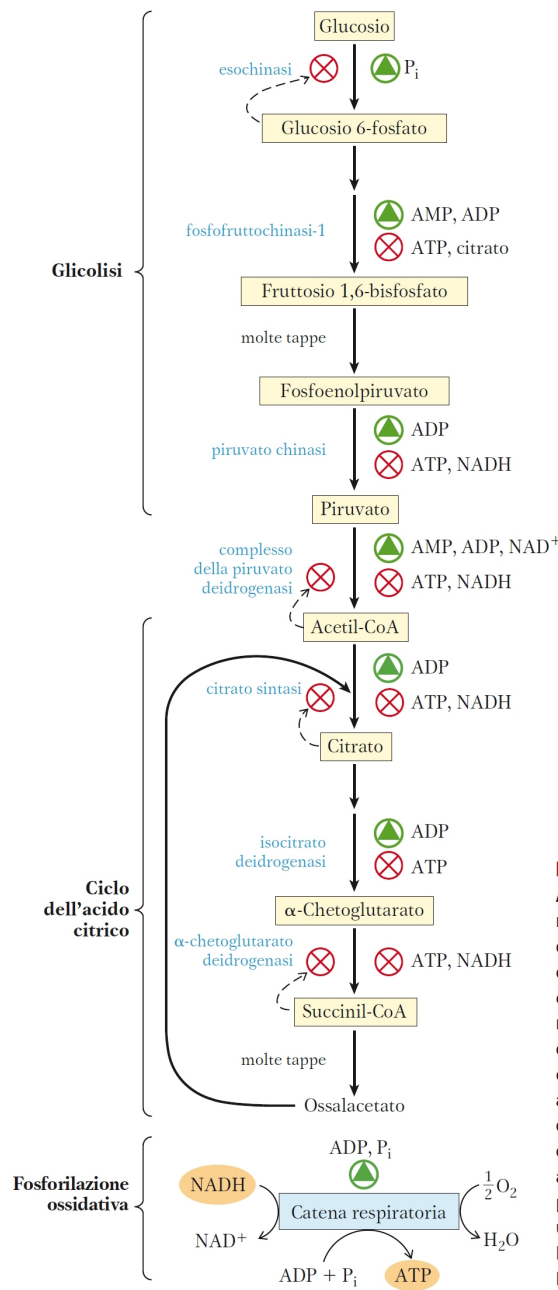
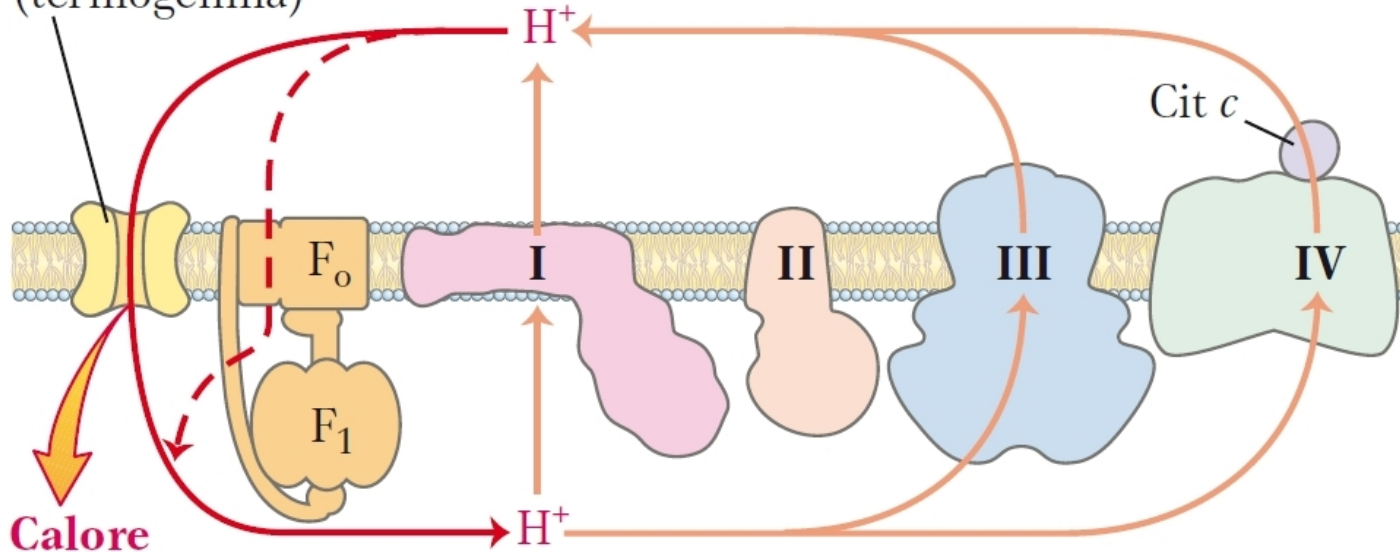


Figura 19.35 Meccanismi di regolazione delle vie che producono ATP. Questo schema mostra i meccanismi interconnessi di regolazione della glicolisi, dell'ossidazione del piruvato, del ciclo dell'acido citrico e della fosforilazione ossidativa, dipendenti dalle concentrazioni relative di ATP, ADP, AMP e NADH. Concentrazioni elevate di ATP (oppure basse di ADP e AMP) producono un rallentamento della glicolisi, dell'ossidazione del piruvato, dell'ossidazione dell'acetato attraverso il ciclo dell'acido citrico e della fosforilazione ossidativa. Tutte e quattro le vie vengono accelerate quando aumentano il consumo di ATP e la formazione di ADP, AMP e P_i . La capacità del citrato di inibire la glicolisi e il ciclo dell'acido citrico rinforza l'azione del sistema dei nucleotidi adeninici. Inoltre un aumento dei livelli di NADH e di acetil-CoA porta all'inibizione dell'ossidazione del piruvato ad acetil-CoA, e un rapporto $[NADH]/[NAD^+]$ molto elevato inibisce rapidamente le reazioni della deidrogenasi del ciclo dell'acido citrico (vedi la Figura 16.19).

Spazio intermembrana (lato P)

Proteina disaccoppiante UCP1
(termogenina)



Matrice (lato N)

Figura 19.36 Generazione di calore mediante disaccoppiamento mitocondriale. La proteina disaccoppiante (UCP1) nei mitocondri del grasso bruno genera una nuova via per il rientro dei protoni nella matrice mitocondriale e dissipa in calore l'energia conservata sotto forma di gradiente protonico.

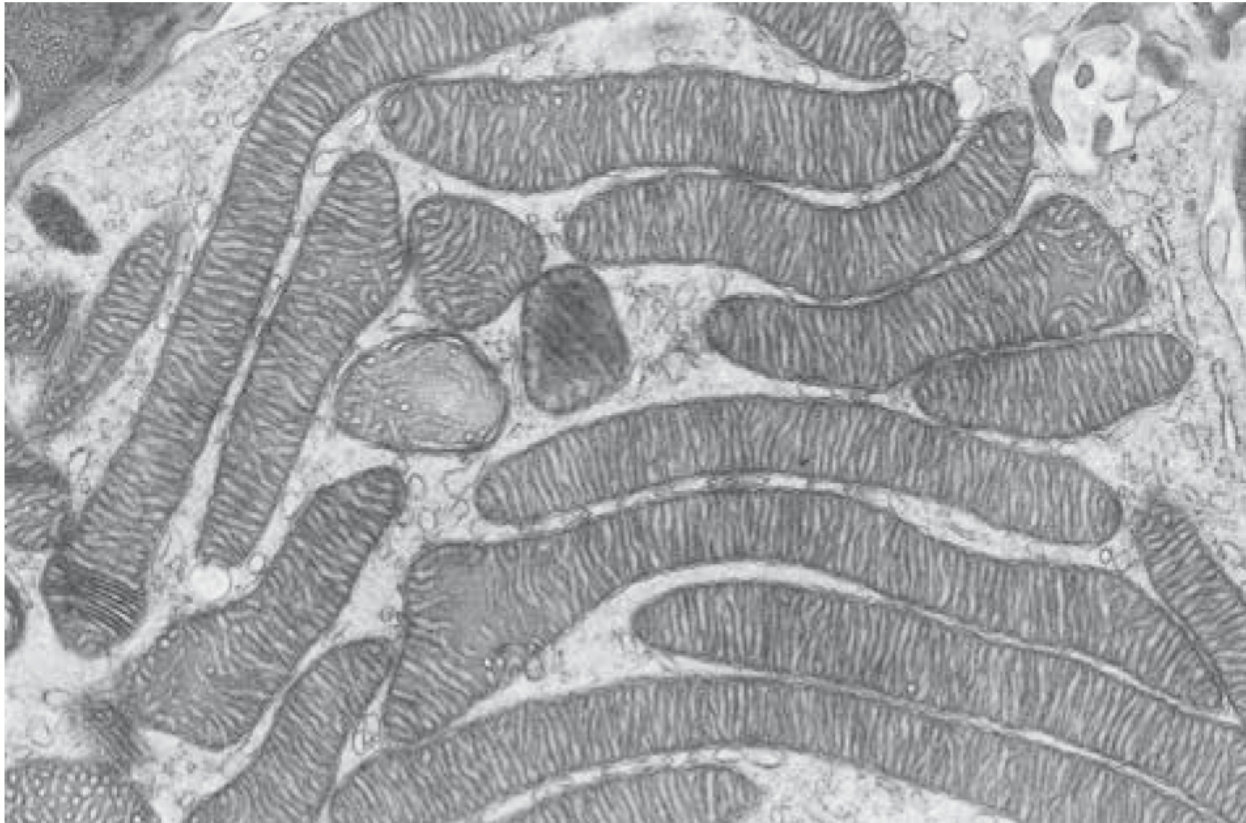


Figura 19.37 I mitocondri della ghiandola surrenale, specializzata nella sintesi degli ormoni steroidei. Come si può osservare in questa fotografia al microscopio elettronico di una sezione sottile di ghiandola surrenale, i mitocondri sono molto numerosi; essi hanno creste molto estese e quindi una vasta superficie per accogliere gli enzimi P-450 nella loro membrana interna. [Fonte: Don Fawcett/Science Source.]

Figura 19.40 Geni mitocondriali e relative mutazioni. Mappa del DNA di mitocondri umani, che mostra i geni che codificano proteine del Complesso I, la NADH deidrogenasi (da *ND1* a *ND6*), il citocromo *b* del Complesso III (*Cit b*), le subunità della citocromo ossidasi (Complesso IV) (da *COI* a *COIII*) e due subunità dell'ATP sintasi (*ATPasi6* e *ATPasi8*). I colori con cui sono indicati i geni corrispondono ai colori dei complessi della Figura 19.7. Sono mostrati anche i geni per gli RNA ribosomiali (*rRNA*) e per un certo numero di RNA transfer specifici dei mitocondri. La specificità degli RNA transfer è indicata utilizzando il codice a una lettera degli amminoacidi. Le frecce indicano posizioni in cui sono note alterazioni (mutazioni) della sequenza di basi che causano la neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON) e l'epilessia mioclonica associata a fibre rosse sfilacciate (MERRF). I numeri tra parentesi indicano la posizione della base modificata (il nucleotide 1 è in alto e la numerazione procede in senso antiorario). [Fonte: informazioni da M.A. Morris, *J. Clin. Neuroophthalmol.* 10:159, 1990.]

